第6卷 第1期
1985年2月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 6, No. 1
Feb., 1985

组蛋白和核酸的^{1}H、^{31}P核磁共振研究*

袁传照 吴 军 曾伟强
（中国科学院遗传研究所 北京）

摘 要

本文报道了组蛋白、DNA、聚核苷酸A和聚核苷酸U的^{1}H、^{31}P高分辨核磁共振研究新结果。

当组蛋白与DNA、聚核苷酸A或U相互作用后，核酸的质子峰变弱或消失。

关键词 组蛋白 核酸 核磁共振

现代分子遗传学、遗传工程领域中，探讨真核细胞遗传基因的选择性激活和抑制的调控分子机制，将有助于阐明细胞分化和细胞癌变的本质。

一般认为组蛋白与细胞周期中染色体所表现的各种形态结构、维系DNA高度螺旋化折叠有关，并在染色质DNA模板活力的抑制方面，起关键作用，是基因表达调控中的非特异性抑制者。核酸则是公认的遗传信息大分子。

研究组蛋白和核酸及其相互作用课题，迄今为止，核磁共振是有效的新技术之一。

作者早先报道过聚核苷酸的核磁共振研究，近来，又介绍了核糖核酸的研究结果以及核磁共振技术在分子生物学、分子遗传学中应用研究的进展。

本文则报道了应用核磁共振技术研究脱氧核糖核酸和组蛋白^{1}H、^{31}P NMR的新结果。

材料和方法

组蛋白是按Johns改良方法从小牛胸腺、昆明小鼠肝、脾中提取制备；DNA是按Kay改良方法从小牛胸腺中提取制备；聚核苷酸U和聚核苷酸A系合成的纯样品。

组蛋白和核酸的^{1}HNMR实验采用ZWH—360兆赫和RMN—250兆赫超导核磁共振波谱和90兆赫脉冲付里叶变换核磁共振仪记录高分辨^{1}H谱。^{1}HNMR实验时，组蛋白

* 本研究承中国科学院化学所、物理所、武汉物理所、北京化工院协助，特致谢意，本文部分内容曾在全国生物化学学术会议上宣读后经补充实验修改而成。

本文1984年3月25日收到，1984年4月13日收到修改稿。

本研究曾得到施履吉教授指导，本文承潘清华教授审阅，谨此一并致谢。

本研究是中国科学院科学基金资助的课题。

和DNA样品是在室温下，分别置入5 mm核磁共振样品管内，滴入纯度为99.8%的中性D_2O，使其充分溶解，浓度10mg/ml。

^{31}PNMR实验是采用100兆赫脉冲付里叶变换核磁共振仪记录^{31}P谱。DNA样品置入10mm核磁共振样品管内，在室温下以中性重蒸馏水作溶剂，浓度10mg/ml。

组蛋白与核酸相互作用的比例是1:1，先在室温下进行，并辅以热处理。

^{1}H谱用四甲基硅烷（TMS）作参比物；^{31}P谱用85%焦磷酸作参比物，并用毛细管封装的D_2O作氘锁。化学位移单位是ppm。

结果和讨论

本研究主要从三方面进行，其结果分述如下：

组蛋白的^{1}H核磁共振实验

在我们的实验条件下，中性D_2O内组蛋白的高分辨^{1}H谱，明显可辨在HOD峰以上的所谓高场区约有14组质子峰；HOD峰以下的所谓低场区显示出4组质子峰；高场区的谱峰主要是脂肪族氨基酸残基侧链和肽链上的质子贡献而成；低场区主要是芳香族氨基酸残基的质子所组成。

图1是用360兆赫超导核磁共振仪一次扫描记录所得到昆明小白鼠肝组蛋白高分辨^{1}H谱。展现了组蛋白各氨基酸质子峰的波形和排布概况。我们实测的小牛胸腺组蛋白、小白鼠肝和脾组蛋白的化学位移参数详见表1。

Table 1 ^{1}H NMR Chemical Shifts of Histones

proton peaks / chemical shifts (ppm)	VAL LEU ILE $-CH_3$	Thr $-CH_3$	ALA $-CH_3$	Lys $-\gamma CH_2$	Lys $-\delta CH_2$	Arg $-\beta CH_2$	Arg $\gamma-CH_2$	Lys $\beta-CH_2$
calf thyams histone	0.73	1.03	1.23	1.30	1.50	1.53	1.63	1.67
reference(5)	0.93	1.23	1.43	1.50	1.70	1.73	1.83	1.87
Mouse liver histone	0.73	1.03	1.23	1.30	1.50	1.53	1.63	1.67
Mouse spleen histone	0.73	1.03	1.23	1.30	1.50	1.53	1.63	1.67

proton peaks / chemical shifts (ppm)	GLu $\beta-CH_2$	Pro $-\beta\gamma CH_2$	GLu $-\gamma CH_2$	Melys $-\varepsilon CH_3$	Lys $-\varepsilon CH_2$	Arg $-\delta CH_2$	Pro $-\delta CH_2$	Ser $-CH_2$
calf thyams histone	1.89	1.90	2.25	2.73	2.86	3.06	3.47	3.70
reference(5)	2.09	2.10	2.45	2.93	3.06	3.26	3.67	3.90
Mouse liver histone	1.89	1.90	2.25	2.73	2.86	3.06	3.47	3.70
Mouse spleen histone	1.89	1.90	2.25	2.73	2.86	3.06	3.47	3.70

proton peaks / chemical shifts (ppm)	Gly $-CH_2$	$-\alpha CH$	Tyr	Tyr	Phe	His	Lys-εCH_2强度 / Arg-δCH_2强度	VAL、ILE、LEu-CH_3强度 / Thr-CH_3强度
calf thyams histone	3.79	4.16	6.61	6.94	7.12	8.46	2.0	6.5
reference(5)	3.99	4.36	6.81	7.14	7.32	8.66	2.0	6.5
Mouse liver histone	3.79	4.16	6.61	6.94	7.12	8.46	2.0	6.5
Mouse spleen histone	3.79	4.16	6.61	6.94	7.12	8.46	2.0	6.5

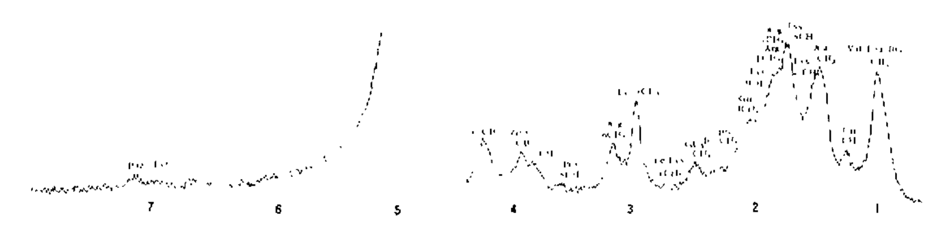


图1　昆明小白鼠肝组蛋白的360兆赫超导核磁共振谱图

Fig. 1　360MH₂ ^1H NMR spectrum of mouse liver histone

分析计算本实验所实测的化学位移较 Boublik 的报道偏小 0.20ppm，可能与我们所用的参比物是外标 TMS 有关。

核酸的^1H和^{31}P核磁共振研究

有关 DNA 的^1H核磁共振研究，早先我们在一文中曾分析了它的低场区各碱基质子峰的排布和化学位移情况，本研究进一步分析 DNA 的高场区质子峰的概况。

图 2 所示，是中性 D_2O 内核酸的250兆赫超导核磁共振仪一次扫描所得到的高分辨^1H谱。图2A是室温下，中性 D_2O 内尚未显示其高分辨谱，图2B是加热至95°C后，小牛胸腺 DNA 的高分辨核磁共振波谱图。经分析，其高场区1.24—1.70ppm处裂分出现两个尖削的甲基峰是来源于胸腺嘧啶核苷酸碱基上的甲基质子贡献而成。Mcdonald 认为，此T—CH_3峰的裂分系存在两个的屏蔽环境所致。1.82—2.64ppm 处宽峰是由脱氧核糖H-2′上的质子贡献而成；在 HOD 峰的紧上侧高耸的大峰是由H-4′、5′的质子贡献而成。在我们的实验中，这些特征峰的显现，暗示了双链 DNA 因热变性碱基对的氢键断裂而有单链形成，其间质子得以贡献的标志。

图 2 C和D则分别是聚核苷酸A和U的低场区高分辨^1H谱。这两种单链聚核苷酸在室温下，中性D_2O内皆显示了良好的高分辨谱。聚A的A，H-8和H-2质子峰出现在7.48—7.60ppm场区；聚U的U，H-6峰位于7.68—7.70ppm处，而U，H-5、H-1′质子峰则出现在5.74ppm场区。

在我们实验中高聚小牛胸腺 DNA 的^{31}P谱峰出现在 1.2ppm 附近（85%焦磷酸液作参比），如图 3 所示，小牛胸腺 DNA 的^{31}P谱另一特征是它的半高宽度可达50Hz左右。Hanlon 认为，当分子量减小到14,000或高分子量的 DNA 经热变性后，它的^{31}P谱峰半高宽度迅速变窄。Yamada在鱼精 DNA 的^{31}P NMR实验中，发现当 DNA 溶液的pH值由3.4改变至11.2时，嘌呤碱和嘧啶碱是去质子化的，它们互补的碱基对之间氢键断裂，所测的^{31}P谱峰形状也由不均称的宽峰转变成在较高场区（1.15 ppm）和较低场区（1.0ppm）两个^{31}P谱峰。认为前者起因于双链 DNA，后者则是单链 DNA 所贡献的。

我们实验中，聚核苷酸A和U的^{31}P谱峰皆呈单一的均称峰形，它们的半高宽度皆在20Hz左右（参见图3B和C）。

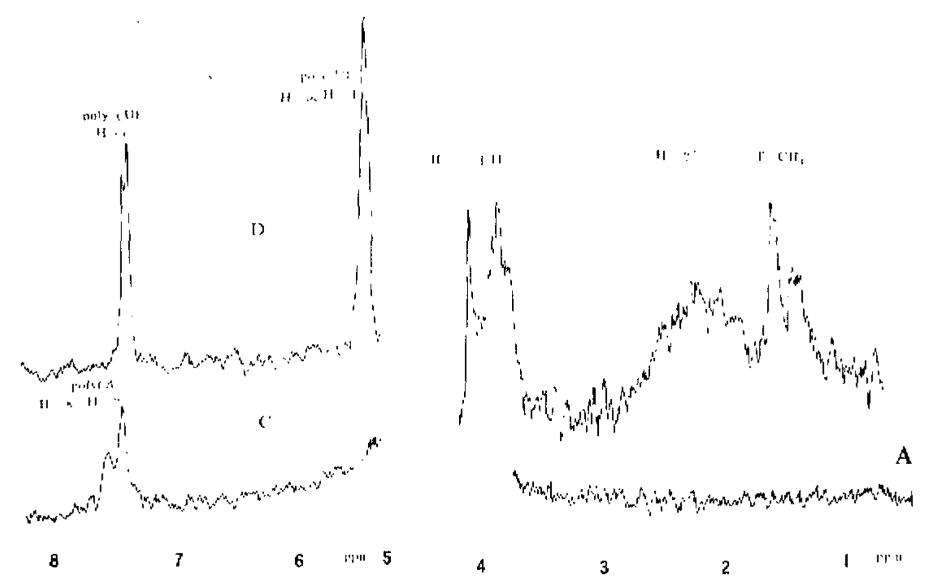


图 2　中性D_2O内核酸的250兆赫超导核磁共振^1H谱图

A—室温下，中性D_2O内DNA；　　C—聚核苷酸A；

B—95℃热处理后的DNA；　　D—聚核苷酸U；

Fig. 2 High resolution NMR spectrum of Nucleic acids

A—^1H NMR spectrum of DNA at room temperature.　　C—^1H NMR spectrum of poly A.

B—^1H NMR spectrum of DNA at 95℃.　　D—^1H NMR spectrum of poly U.

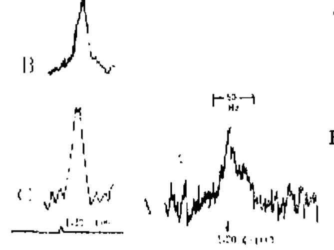


图 3　核酸的^{31}P核磁共振波谱图

A—小牛胸腺DNA；

B—聚核苷酸A；

C—聚核苷酸U；

Fig. 3 ^{31}P NMR spectrum of nucleic acid

A—^{31}P NMR spectrum of calf thymus DNA.

B—^{31}P NMR spectrum of poly A.

C—^{31}P NMR spectrum of poly U.

实验表明，根据核酸的^1H和^{31}P核磁共振研究中对^1H谱峰和^{31}P谱峰特征、峰形、半高宽度和化学位移值的分析，有助于判断核酸类大分子的单双链存在的状态，提供某些结构或构型的有用信息。

组蛋白与核酸相互作用的核磁共振

组蛋白与DNA皆是真核细胞染色体中的主要生物分子，含量皆相当多，两者比例约为1:1。

在上述实验的基础上，进一步进行组蛋白与DNA相互作用的实验。图4A是42°C热处理后的中性D_2O内DNA的脉冲付里叶变换核磁共振仪的高场区波谱记录。此时，尚观察不到良好的高分辨谱。图4B是加热100°C 15′后DNA高场区^{1}H谱，可见到位于1.24—1.70ppm处极为显著的T-CH_3峰，启示着DNA双螺旋链已因热变性而解开。图4C是将加热100°C15′后的DNA样品与等量的组蛋白相互作用，高场区的T-CH_3质子峰消失。描记所得又仅为一水平基线。

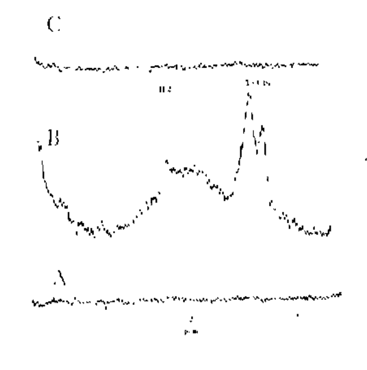


图4　组蛋白与DNA相互作用的高分辨^{1}H谱
A—42℃的DNA；
B—加热100℃的DNA；
C—DNA+组蛋白

Fig. 4 High resolution ^{1}H NMR spectrum of DNA and their interaction with histone
A—^{1}H NMR spectrum of DNA at 42℃
B—^{1}H NMR spectrum of DNA at 100℃
C—^{1}H NMR spectrum of DNA and their interaction with histone at 100℃

图5A—1和5A—2所示是聚核苷酸U及其与组蛋白相互作用的核磁共振^{1}H谱图，显示出聚U低场区的U，H—6和U，H—5、H—1′等质子峰在加进等量组蛋白相互作用后，它们的谱峰强度皆显著降低。

图5B—1和图5B—2是聚核苷酸A及其与组蛋白相互作用的核磁共振^{1}H谱图，显示出聚A低场区的A、H—8、H—2和H—5、H—1′等质子峰在加进等量组蛋白相互作用后，它们的谱峰强度也明显降低。

图5C则是含有组蛋白的聚U与含有组蛋白的聚A等量混合后的波谱记录，显示出两者碱基配对已迅速进行着。反映在聚U：聚A的低场区诸质子峰的强度进一步低弱得几乎难以辨认。

图5D是上述样品加热15′后的波谱记录，它与图5C比较，变化不显。

我们的波谱资料表明，双链DNA因热变性，高场出现了显著的T-CH_3等质子峰，反映了单链DNA的形成。组蛋白与热变性的DNA相互作用后，高场区的T-CH_3等质子峰消失，记录所得又只见一水平基线，反映出因热变性而由双链解聚成单链DNA。由于加进的组蛋白相互作用，易于重新合成双螺旋结构的DNA。

当组蛋白分别与单链的聚U，聚A相互作用后，它们的低场区U，H—6，U，H—5、H—1′以及A，H—8、H—2，H—5、H—1′等诸质子峰强度皆降低约一倍多。暗示了聚U和聚A与组蛋白肽链上发生了有选择性的相互作用。在碱性多肽与聚核苷酸组合研究中，一般认为聚U与组蛋白肽链上富精氨酸部位有较大的亲合性，而聚A则与富赖氨酸的部位有较大的亲合性。

当将含有组蛋白的聚U和聚A进行碱基配对，上述碱基诸质子峰的强度又进一步降低得只能隐约可认。在一般情况下，聚U：聚A等的双链聚核苷酸在加热不到100°C便

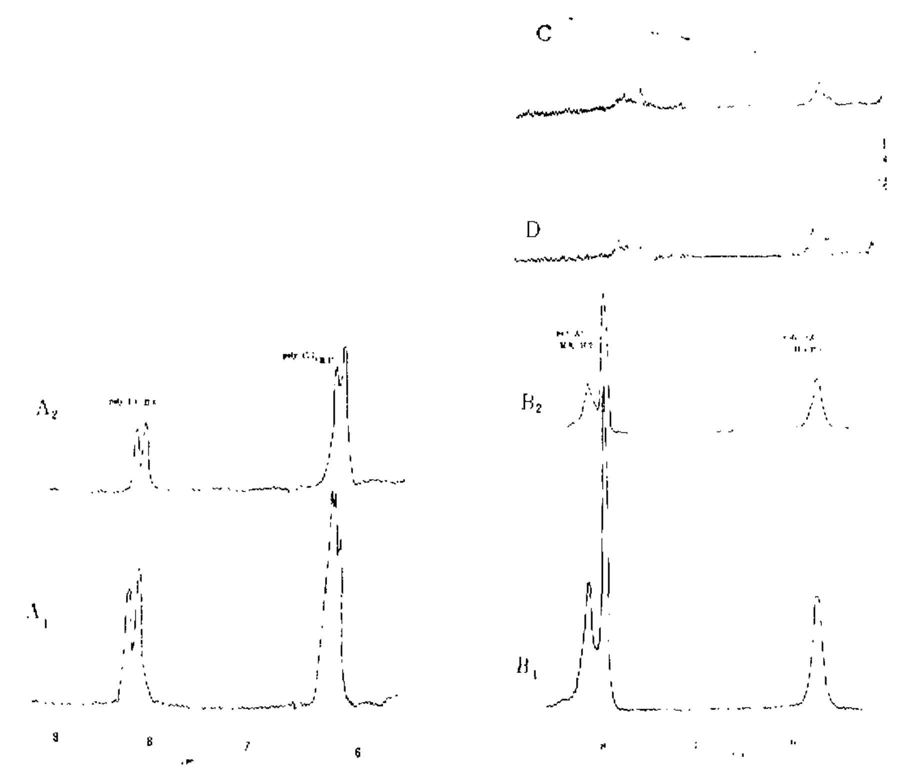


图5 聚核苷酸及其与组蛋白相互作用的高分辨¹H谱

5A—1——聚U　5B—1——聚A

5A—2——聚U与组蛋白相互作用；　5B—2——聚A与组蛋白相互作用；

5C——室温下含组蛋白的聚U与含组蛋白的聚A等量混合；

5D——上述样品加热100℃，15′后的¹H谱

Fig. 5 High resolution ¹H NMR spectrum of poly U and poly A and their interaction with histone

A_1—¹H NMR spectrum of poly U.

A_2—¹H NMR spectrum of poly U and their interaction with histone.

B_1—¹H NMR spectrum of poly A.

B_2—¹H NMR spectrum of poly A and their interaction with histone.

C—¹H NMR spectrum of sample A_2 and B_2 at room temperature.

D—¹H NMR spectrum of sample A_2 and B_2 at 100℃.

会解聚而成两条单链聚核苷酸，在波谱图上随之表现在低场区有U，H—6，U—5、H—1′以及A，H—8、H—2，H—5、H—1′等质子峰的再现。我们发现加进组蛋白后再加热100°C 15′后聚核苷酸的上述质子峰强度仍基本保持原状。启示了因其与组蛋白相互作用后，聚U：A的双螺旋结构仍较稳固。这些结果支持了 Smart 等（1971）认为组蛋白能使核酸的熔点升高并能增强DNA的双螺旋构型稳定性的观点。

我们根据对质子峰的弱化程度分析表明，等量的组蛋白与核酸相互作用的亲合性，

是双链DNA比单链DNA为大。组蛋白对RNA类的聚U和聚A的亲合性也是双链比单链为大。

实验表明，深入地研究组蛋白与核酸及其相互作用的核磁共振波谱学，能为探讨遗传物质和调控物质的结构与功能提供新的重要参数，为分子遗传学、遗传工程积累一些其它技术所不能提供的新资料。

参 考 文 献

袁传熙 1974 核磁共振技术在生物学中的应用，《核磁共振波谱仪及其应用》；263—280。科学出版社

中国科学院遗传研究所550组、101组 1977 核酸类干扰素诱导物的高分辨核磁共振研究。遗传学报 4:339

袁传熙 1978 核磁共振与分子生物学研究。物理 2:18

袁传熙 张诚 吴军 1984 核糖核酸及其组蛋白相互作用 $^{1}H_{1}$、^{13}C、^{31}P 核酸共振研究。生物化学与生物物理学报 16:315

袁传熙 1983 核磁共振在生物学中应用的新进展。国外医学分子生物学分册，5:301

袁传熙 1980 核酸、聚核苷酸的 $^{1}H_{1}$、^{13}C、^{31}P核磁共振研究 中国科学院遗传研究所工作年报 2:195

Boublik, M. *et al* 1970 *Eur. J. Biochem.* 14:486

Bradbury, E. M. *et al* 1973 *Biophysique.* 34:11—12

Hanlon, S. *et al* 1976 *Biochemistry* 15:3870

Johns, E. W. *et al* 1964 *Biochem. J.* 92:55

Mclonald, W, D. phillips 1964 *Science.* 144:1234

Mclonald, W. D. phillips and J. Lazar 1967 *J. Amer. Chem. Soc.* 89:4166

Oliver, D. *et al* 1972 *Biochem. J.* 129:349

Smart, D. E. *et al* 1971 *J. Mol. Biol.* 58:651

Yamada, A. *et al* 1978 FEBS. *Lettes.* 93:16

HIGH RESOLUTION ^{1}H、^{31}P NMR STUDIES OF HISTONES AND NUCLEIC ACIDS

Yuan Chuanzhao　Wu Ju　Zeng Wei Qiang

(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing)

High resolution ^{1}H, ^{31}P NMR spectra of Histones, DNA, Poly A and poly U in D_2O or H_2O Solutions were measured.

The proton peaks of the Nucleic Acids became weak or these peaks completely disappeared, when Histones was added in The solution of DNA , poly A and poly U.

Key words　Histone　Nucleic acid　High resolution